

RODRIGO FALLER VITALE

EXPRESSÃO DO RECEPTOR TIPO DOIS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL
ALFA NO COLESTEATOMA ADQUIRIDO DA ORELHA MÉDIA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São
Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando de A. Quintanilha Ribeiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Celina Siqueira Barbosa Pereira

São Paulo

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Diego, por seu sorriso, e ao meu avô, pelo exemplo de vida e de persistência até a hora de pegar o trem.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando de A. Quintanilha Ribeiro, pela orientação competente e pela força para continuar;

À Prof. Dra Celina S. B. Pereira, pela orientação e dedicação constante;

Aos Profs. Drs. José Alexandre M. da Silveira, Mario B. R. Guiss (*in memoriam*), Oswaldo Martucci Jr. e Silvio A. M. Marone, pelo incentivo na busca do aperfeiçoamento e pela inspiração na arte de ensinar;

Aos residentes e preceptores da Clínica Otorhinus e do Hospital Santa Marcelina, pela confiança e constante apoio;

Aos Profs. Drs. Adriana L. Alves, Edson I. Mitre, Fátima R. A. Alves e Bianca M. Liquidato, pelas contribuições no Exame de Qualificação;

Ao Prof. Dr. José Humberto T. G. Fregnani, pelas análises estatísticas;

À Eliana Neto de Oliveira, técnica de histologia e imunohistoquímica do Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, pela confecção das lâminas;

À Sonia Alves, pela inestimável ajuda no desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos que, diretamente ou indiretamente, participaram deste trabalho;

À Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e à Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho, pelo estímulo constante a novas pesquisas;

À CAPES, pelo suporte financeiro;

À FAPESP, pelo suporte financeiro;

E, principalmente, à minha família, por todo carinho

Meus Agradecimentos

ABREVIATURAS

COX-2: enzima cicloxigenase isoforma 2

EGF: fator de crescimento epidérmico

FA: fosfatase ácida

G-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos

HE: Hematoxilina-Eosina

ICAM-1: molécula de adesão intercelular 1

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

I κ B: proteínas inibidoras kappa B

I κ B quinase: proteínas inibidoras kappa B quinase

Imunohistoquímica: IHQ

iNOS: sintase do óxido nítrico indutível

KGF: fator de crescimento de queratinócitos

LFA: antígeno funcional linfocítico 1

M-CSF: fator estimulador de colônias de macrófagos

NF- κ B: fator nuclear NF-kappa B

NO: óxido nítrico

PCR: reação em cadeia da polimerase

PGE2: prostaglandina E2

RANKL: ligante do ativador do receptor do fator nuclear kappa

TGF- α : fator transformador do crescimento alfa

TGF- β : fator transformador do crescimento beta

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

TNF-R: receptor do fator de necrose tumoral

TNF-R1: receptor tipo1 do fator de necrose tumoral

TNF-R2: receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral

TRADD: proteína de domínio de morte associada ao receptor de TNF

TRAF: fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral

VCAM-1: molécula de adesão vascular 1

Sumário:

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão da literatura	6
1.1.1 Propriedades gerais do TNF- α e do TNF-R.....	6
1.1.2 Ação do TNF- α e de outras proteínas relacionadas ao processo de erosão óssea no colesteatoma adquirido da orelha média	9
1.1.3 Comparação do TNF-R2 e do TNF-R1 no processo inflamatório.....	17
2 - Objetivo	19
3 - Material e Métodos	20
4 - RESULTADOS	30
5 - DISCUSSÃO	36
6 - CONCLUSÕES	43
7 - ANEXOS	44
7.1 ANEXO 1	44
7.2 ANEXO 2	45
7.3 ANEXO 3	46
7.4 ANEXO 4	47
7.5 ANEXO 5	48
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
FONTES CONSULTADAS	52
RESUMO	53
ABSTRACT	55
Apêndices	56

1 - INTRODUÇÃO

O colesteatoma adquirido da orelha média foi descrito pela primeira vez por Curvelhier, em 1829¹ (citado por Ribeiro, Pereira, 2003). É caracterizado pela invasão da cavidade timpânica por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, diferente do epitélio pseudo-estratificado colunar ciliado com células caliciformes presente na região próxima à tuba auditiva ou do epitélio simples, pavimentoso, cúbico ou colunar, no restante da orelha média (Alves et al, 2008). Histologicamente, o colesteatoma pode ser dividido em matriz (epitélio) e perimatriz (tecido conjuntivo subjacente), segundo Lim, Saunders (1972).

A matriz do colesteatoma possui quatro camadas distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea, assim como a pele fina. Já a perimatriz é caracterizada pela presença de tecido conjuntivo frouxo composto por fibras colágenas, elásticas, fibroblastos, bem como células inflamatórias (Pereira, 2001). A análise histológica da matriz do colesteatoma pode evidenciar diferentes padrões: atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e presença de cones epiteliais. É frequente o encontro de vários desses padrões, simultaneamente, em um mesmo caso (Alves et al, 2008).

O colesteatoma promove frequentemente a destruição da cadeia ossicular, sendo a bigorna o ossículo mais acometido, seguido pelo estribo e martelo, segundo Tos (1979) e Dornelles et al (2007).

Devido a sua capacidade de causar erosão óssea, o que ocorre em aproximadamente 80% dos casos (Kurihara et al, 1991), o colesteatoma é

¹ Curvelhier, (1829) apud Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite média crônica colesteatomatosa In: SBORL. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Roca; 2003.p.93-102.

responsável por complicações extracranianas e intracranianas. No primeiro grupo, temos a paralisia facial periférica, a fístula perilinfática, a mastoidite de Bezold, a labirintite infecciosa, o abscesso periostal e a petrosite. No segundo (intracranianas) estão os abscessos extradurais, subdurais, cerebrais e cerebelares, além da meningite otogênica e da tromboflebite do seio sigmóideo. Essas complicações, quando presentes, têm alta taxa de morbidade e mortalidade (Lessa et al, 2003). Por essas razões torna-se relevante o estudo dos mecanismos pelos quais o colesteatoma adquirido da orelha média promove a erosão óssea.

Existem diversas teorias para explicar as propriedades destrutivas do colesteatoma adquirido da orelha média. Em 1969, Schechter propôs que a pressão exercida pelo acúmulo de queratina e de outros resíduos seria a responsável pela destruição óssea; porém, essa teoria não era suficiente para explicar todos os casos nos quais se observava erosão. Assim, posteriormente, surgiu a teoria bioquímica, segundo a qual algumas enzimas liberadas pelo colesteatoma (colagenases) teriam a capacidade de causar lise óssea (Schechter, 1969). Segundo esse autor, estas enzimas seriam encontradas também na epiderme normal; entretanto, seriam sintetizadas e liberadas em maiores quantidades pelo colesteatoma, levando à erosão óssea. Atualmente as colagenases são denominadas metaloproteinases (Dornelles, 2008).

Na década de 1970, Carswell et al (1975) comprovaram a existência do fator de necrose tumoral *in vitro*. Essa molécula pesa aproximadamente 17.000 Dalton e possui 157 aminoácidos em sua estrutura (Pennica et al, 1984).

No início da década de 90, surgiram os primeiros trabalhos sugerindo que o TNF- α fosse uma importante citocina envolvida no processo de destruição óssea

(Iino et al, 1990 e Kreutzer et al, 1991). Alves, Ribeiro (2004), em um trabalho de revisão da literatura, concluíram que as citocinas liberadas pelas células inflamatórias da perimatriz seriam as responsáveis pela destruição óssea presente no colesteatoma. Dentre elas, o TNF- α destaca-se como sendo uma das principais citocinas envolvidas neste processo favorecendo, com o ligante do ativador do receptor do fator nuclear Kappa B (RANKL) e as interleucinas 1 e 6, a destruição e a remodelação óssea (Vitale, Ribeiro 2007).

O TNF- α pode ser produzido por macrófagos, linfócitos e monócitos. O principal estímulo para sua síntese são os lipopolissacarídeos que compõem a membrana citoplasmática das bactérias Gram negativas (Yan, Huang, 1991). O TNF- α liga-se a receptores específicos localizados na membrana celular. Existem dois tipos de receptores de TNF: o tipo um (TNF-R1) e o tipo dois (TNF-R2), que estão presentes em praticamente todas as células do nosso organismo (Bingham, 2002).

Há descrição da presença do TNF-R2 em diferentes órgãos como, por exemplo, o rim, o cérebro e o ovário, estando sempre associado ao processo inflamatório, devido à ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (Bingham, 2002; Ramesh, Reeves, 2003; Abdo et al, 2008).

Não existe consenso sobre qual receptor é o mais importante para desencadear o processo inflamatório. Alguns autores como Ramesh, Reeves (2003) e Grech et al (2005) consideram o TNF-R2 mais importante, contrastando com McFarlane et al (2002) que acreditam ser o TNF-R1.

Os dois receptores de TNF- α possuem atividades semelhantes. Estão envolvidos no processo inflamatório, relacionam-se à erosão óssea e podem desencadear a apoptose (morte celular programada), sendo que essa última atividade está associada principalmente ao TNF-R2. Entretanto, o mecanismo que determina qual efeito será dominante ainda não está totalmente esclarecido (Bingham, 2002).

Segundo Bingham (2002), após a ligação do TNF- α ao seu receptor ocorre a liberação de um conjunto de substâncias denominadas de fatores associados ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF). O TRAF, por sua vez, irá ativar a enzima I κ B quinase (IKK). No citoplasma existe uma proteína denominada fator nuclear kappa B (NF- κ B), que se encontra na sua forma inativa. A produção da enzima IKK promove a ativação do NF- κ B, que age no núcleo celular estimulando a produção de mais de 60 genes que participam da resposta inflamatória (Alberts et al, 2002).

Amar et al (1996), Akimoto et al (2000) e Yetiser et al (2002) demonstraram a presença do TNF- α no colesteatoma adquirido da orelha média e sua relação com a erosão óssea.

Para que se compreendam as características de agressividade do colesteatoma é necessário o estudo da presença e da distribuição dos receptores do TNF- α , já que somente após a ligação da citocina ao seu receptor é que ocorrerá a liberação das substâncias responsáveis pela lise óssea.

Este trabalho foi desenvolvido dentro da linha de pesquisa (estudo dos sinalizadores do colesteatoma), que vem sendo desenvolvida no Departamento de

Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo.

1.1 Revisão da literatura

1.1.1 Propriedades gerais do TNF- α e do TNF-R

As citocinas são proteínas que atuam na comunicação intercelular e podem exercer sua ação por mecanismo autócrino (quando agem na própria célula que a produziu), parácrino (atuam em células vizinhas) ou endócrino (exercem seu efeito à distância). Além disso, são pleiotrópicas, ou seja, podem provocar efeitos diferentes, dependendo do local de ação (Abbas et al, 1998).

O TNF- α é uma das principais citocinas envolvidas no processo inflamatório e imunológico. Segundo Abbas et al (1998), o TNF- α age nas células endoteliais, estimulando a expressão de novos receptores celulares que irão promover a adesão de neutrófilos, monócitos e linfócitos. O TNF- α também estimula as células endoteliais a secretarem um grupo de citocinas (denominadas quimiocinas) com ação quimiotática sobre os leucócitos.

A ação do TNF- α nas células endoteliais e nos leucócitos é fundamental para que ocorra reação inflamatória local, responsável por combater os quadros infecciosos. Entretanto, quando o TNF- α é produzido em grande quantidade, pode promover o choque séptico, a falência cardíaca e ainda a trombose intravascular decorrente do efeito endócrino desta citocina (Abbas et al, 1998). A ação do TNF- α sobre o hipotálamo induz febre (pirógeno endógeno) por meio do aumento da síntese de prostaglandinas. No fígado, estimula a produção das proteínas da fase aguda do processo inflamatório e do fibrinogênio, juntamente com as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6). O TNF- α age, também, na erosão óssea, promovendo a

diferenciação e a ativação dos osteoclastos (Abbas et al, 1998). As principais ações do TNF- α podem ser observadas na figura do anexo 1.

Segundo Bingham (2002), o TNF- α pode ser produzido por macrófagos ativados, linfócitos ou monócitos. O principal estímulo para a sua produção são os lipopolissacarídeos que compõem a membrana citoplasmática das bactérias Gram negativas. O TNF- α produzido irá ligar-se aos receptores de membrana específicos denominados: TNF-R1 e TNF-R2. Os receptores, quando ativados, estimulam, no citoplasma, a produção de proteínas denominadas fatores associados aos receptores do fator de necrose tumoral (TRAF).

No citoplasma existe um conjunto de proteínas que estão inativas denominado I κ B. A produção do TRAF, decorrente da ativação dos receptores de TNF- α , promove a transcrição e a produção da enzima I κ B quinase. Essa enzima irá estimular o complexo I κ B a ativar o fator nuclear kappa B (NF- κ B). A ativação do NF- κ B estimula a enzima cicloxigenase isoforma 2 (COX-2), responsável pela indução do processo inflamatório e produção de prostaglandinas e tromboxanos. Além disto, o NF- κ B estimula a produção de interleucinas (IL-1, IL-6) e de fatores de crescimento, ocorrendo uma reação em cascata e de sinergismo entre elas, aumentando a resposta local. Os fatores de crescimento liberados, pela ativação do complexo NF- κ B, estimulam a maturação e diferenciação dos osteoclastos, responsáveis pela reabsorção óssea. O NF- κ B estimula a produção de proteínas da fase aguda da inflamação e de moléculas que regulam a imunidade, induzindo, dessa forma, a reabsorção óssea. Além do TNF- α , outras citocinas, como a IL-1 e a IL-6, podem ativar o complexo NF- κ B, desencadeando respostas semelhantes

(Bingham, 2002). As ações do TNF- α na célula podem ser observadas na figura do anexo 2.

Ainda segundo Bingham (2002), a ação do TNF- α sobre a erosão óssea ocorreria por duas vias distintas: a direta e a indireta. Pela via direta o TNF- α atuaria incrementando a produção de prostaglandinas, as quais agiriam principalmente na cartilagem e no osso, causando reabsorção óssea devido à ativação dos osteoclastos. Já a via indireta ocorreria por meio da estimulação da produção de óxido nítrico (NO), que ativaria as metaloproteinases, causaria vasodilatação, aumentando o fluxo sanguíneo e atraindo um maior número de células inflamatórias no local, inibiria a síntese de colágeno e de proteoglicanos e estimularia a apoptose. Desta forma, este autor concluiu que o TNF- α exerce papel fundamental na reabsorção óssea.

1.1.2 Ação do TNF- α e de outras proteínas relacionadas ao processo de erosão óssea no colesteatoma adquirido da orelha média

Yan, Huang (1991) estudaram o papel do TNF- α na reabsorção óssea promovida pelo colesteatoma. Os autores analisaram, por meio de métodos imunohistoquímicos, dez fragmentos de colesteatoma, sendo que cinco deles foram coletados durante procedimento cirúrgico em seres humanos e os outros cinco, obtidos de ratos que tiveram colesteatoma induzido após a aplicação de propilenoglicol na orelha média. Além disto, os autores realizaram cultura de células de tecido ósseo (retirado da tíbia e fêmur dos ratos). A essas culturas de células, os autores adicionaram TNF- α recombinante. As culturas com TNF- α foram comparadas com um grupo controle sem adição do TNF- α . Os autores, entretanto não especificaram quantas culturas foram realizadas em cada caso. Yan, Huang avaliaram a expressão do TNF- α , das colagenases, das prostaglandinas, da fosfatase ácida (FA) e a presença de células multinucleadas, bem como a intensidade de suas atividades, nos dez fragmentos de colesteatoma. Os autores observaram que os colesteatomas humanos e os experimentais apresentavam graus variados de processo inflamatório, com infiltrado mononuclear (linfócitos e macrófagos) e sinais de neoformação vascular. O estudo imunohistoquímico evidenciou a presença de TNF- α nas células mononucleares, macrófagos e fibroblastos do tecido de granulação. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os colesteatomas coletados durante o ato cirúrgico e os experimentais em relação à histologia e à imunohistoquímica. Yan,

Huang observaram que a adição de TNF- α às culturas ósseas estimulava a formação de células multinucleadas (osteoclastos) e produziam lacunas na superfície óssea (lacunas de Howship). Além disso, a produção de collagenases e prostaglandinas (PGE2) por osteoblastos, assim como a de FA pelos macrófagos, estava aumentada. Nas culturas de células ósseas sem a adição do TNF- α essas alterações não foram observadas. Dessa forma, esses autores concluíram que o TNF- α age na reabsorção óssea, estimulando a formação de osteoclastos, PGE2, collagenases e FA.

Amar et al (1996) estudaram a destruição óssea provocada pelo colesteatoma e, para isso, analisaram 50 fragmentos coletados de pacientes que foram submetidos à cirurgia por otite média crônica colesteatomatosa. Os autores detectaram, por meio da imunohistoquímica, a expressão do TNF- α , a atividade da FA, a leucina aminopeptidase, a lisozima e a catepsina B. Eles compararam os fragmentos de colesteatoma com fragmentos de pele do meato acústico externo, retirados de 14 pacientes submetidos à cirurgia otológica por outras doenças. Os colesteatomas foram divididos em dois grupos: localizados e extensos. Essa classificação se baseou na presença de erosão da cadeia ossicular, erosão do canal do nervo facial, exposição da dura-máter e do seio sigmóideo. A expressão de TNF- α foi significativamente maior nos fragmentos de colesteatoma quando comparada com a pele normal do meato acústico externo (MAE), bem como a das outras variáveis bioquímicas analisadas. Os autores observaram uma expressão elevada dessas variáveis bioquímicas nos colesteatomas extensos quando comparados aos localizados. De acordo com Amar et al (1996) a intensidade do

processo inflamatório local estava relacionada com o grau de erosão óssea causada pelo colesteatoma. Segundo esses autores, o TNF- α promoveria a reabsorção óssea, estimulando os osteoblastos a produzirem o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), que, por sua vez, agiria na diferenciação e maturação dos osteoclastos. Além desse mecanismo direto, o TNF- α ativaria as prostaglandinas, as colagenases, a FA, os fibroblastos e os macrófagos, que induziriam a desmineralização do osso, expondo sua matriz e favorecendo a reabsorção. Em sua pesquisa, os autores demonstraram que todas as variáveis estudadas apresentavam expressão maior no colesteatoma, quando comparadas com a pele normal e estavam relacionadas com o grau de destruição óssea observada no intra-operatório. Assim, Amar et al (1996) concluíram que as citocinas, em especial o TNF- α , estão envolvidas diretamente na destruição óssea causada pelo colesteatoma. Desta forma, eles sugeriram o tratamento da infecção com antibióticos e antiinflamatórios, os quais diminuiriam a liberação das citocinas frente a um processo inflamatório e poderiam reduzir a reabsorção óssea provocada pelo colesteatoma.

Chung, Yoon (1998) analisaram a erosão óssea presente no colesteatoma. Os autores coletaram 14 fragmentos de pele do MAE e 14 de colesteatomas durante procedimento cirúrgico. Eles separaram o tecido conjuntivo subepitelial do epitelial nos fragmentos de colesteatoma e de pele do MAE e realizaram culturas destes tecidos. Foi coletado o sobrenadante dessas culturas no segundo, quinto e sétimo dia para a análise da concentração, por meio de ELISA, da interleucina 1 alfa e beta (IL-1 α e IL-1 β) e da interleucina oito (IL-8). Os autores observaram que

as concentrações dessas três citocinas estavam significativamente maiores nas culturas de tecido conjuntivo subepitelial de fragmentos de colesteatoma, no segundo dia, quando comparadas às culturas de pele do MAE. Nas dosagens subsequentes eles observaram um decréscimo progressivo nas concentrações de IL-1 α e IL-8, enquanto a IL-1 β permanecia estável. Os autores concluíram que o estímulo das células inflamatórias da perimatriz sobre o epitélio cessou em decorrência da separação dos tecidos (epitelial e conjuntivo), fazendo com que as interleucinas IL-1 α e IL-8 parassem de ser produzidas, sendo necessária a interação entre a matriz e a perimatriz, para que ocorra o efeito biológico destas citocinas

Sastry et al (1999), baseados nos trabalhos anteriores de Yan, Huang (1991) e Amar et al (1996), determinaram o papel do TNF- α na destruição óssea observada no colesteatoma adquirido da orelha média. Eles dosaram o nível sérico de TNF- α em 20 pacientes saudáveis (grupo controle) e em 20 pacientes que seriam submetidos à cirurgia por colesteatoma da orelha média. No ato cirúrgico, coletaram fragmentos de colesteatoma para análise imunohistoquímica. Os autores dividiram os pacientes com colesteatoma em dois grupos de acordo com o grau de erosão óssea observado no intra-operatório. No primeiro grupo (11 pacientes) foram incluídos os indivíduos que apresentavam erosão de apenas um ossículo e, no segundo (oito pacientes), os que apresentavam erosão de dois ou mais ossículos. Os autores observaram que, nos pacientes submetidos à cirurgia otológica, o nível sérico (prévio) de TNF- α estava significativamente aumentado (17 a 153 pg/ml), quando comparado ao grupo controle (2 a 17 pg/ml). Também foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no nível sérico de

TNF- α dependendo do grau de destruição óssea (maior no segundo grupo). Não foram observadas diferenças em relação à faixa etária dos pacientes (menores ou maiores de 15 anos). Sastry et al (1999) observaram, por meio de técnicas imunohistoquímicas, que a expressão do TNF- α na camada basal da matriz e no tecido conjuntivo subepitelial era maior nos fragmentos dos colesteatomas associados a uma maior destruição óssea do que nos fragmentos sem erosão óssea, sugerindo que a elevada expressão desta citocina nestas camadas fosse responsável pelo aumento do nível sérico de TNF- α .

Akimoto et al (2000), estudando o papel do TNF- α no processo inflamatório, coletaram 43 fragmentos de colesteatomas durante procedimentos cirúrgicos, sendo dez fragmentos de colesteatomas congênitos e 33 de colesteatomas adquiridos. Foram excluídos pacientes com outras anomalias otológicas congênitas e nenhum paciente recebeu corticóide antes da cirurgia. Os pacientes foram classificados de acordo com a severidade da doença. Para isso, eles avaliaram, durante o intra-operatório, o grau de infecção (leve, moderada ou severa) e o grau de erosão óssea dependendo do número de estruturas acometidas: erosão do martelo, bigorna e estribo e exposição da dura-máter, do seio sigmóideo e do nervo facial. Os autores, por meio das técnicas de radioimunoensaio (ELISA), de imunohistoquímica e da reação em cadeia da polimerase (PCR) determinaram a presença e a expressão do TNF- α , da IL-1, de moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1) e do antígeno funcional linfocítico-1 (LFA-1). Com a coloração de hematoxilina-eosina foi realizada também a contagem de células presentes no infiltrado inflamatório. Além disso, determinaram o RNA-mensageiro para TNF- α e IL-1, pela técnica de PCR,

observando que o TNF- α estava presente somente no tecido conjuntivo subepitelial dos fragmentos de colesteatomas. A análise estatística revelou que a expressão do TNF- α e da IL-1 estava igualmente elevada nos colesteatomas adquiridos em relação aos congênitos. Houve correlação forte entre a gravidade da doença (erosão óssea e grau de infecção) e a expressão do TNF- α e uma correlação fraca entre a gravidade da doença e a IL-1, tanto nos colesteatomas congênitos quanto nos adquiridos. O TNF- α foi encontrado principalmente no infiltrado inflamatório da perimatriz dos colesteatomas adquiridos e na camada basal da matriz dos colesteatomas congênitos, demonstrando uma diferença de localização entre os dois tipos de colesteatomas estudados; porém, em relação ao grau de erosão óssea, não observaram diferenças significativas. Já o ICAM-1 e LFA-1 estavam aumentados somente nos colesteatomas adquiridos. Comparando a severidade da doença (achados intra-operatórios) com os achados imunohistoquímicos, os autores demonstraram uma correlação entre os níveis do TNF- α e a severidade da doença (reabsorção óssea) em ambos os tipos de colesteatoma. Somente no colesteatoma adquirido a expressão de ICAM-1 foi relacionada ao grau de infecção, ocorrendo, segundo os autores, uma correlação entre os níveis de TNF- α e a expressão de ICAM-1. Já, quanto a IL-1, não observaram essa correlação. Os autores concluíram que o TNF- α possui um papel fundamental na patogênese dos colesteatomas (adquiridos e congênitos), regulando o grau de reabsorção óssea e o infiltrado celular presente.

Yetiser et al (2002), compararam os níveis do TNF- α , da IL-1 e do fator de crescimento epidérmico (EGF) em fragmentos retirados de 16 pacientes com otite média crônica não colesteatomatosa (tecido de granulação) e de 23 com otite

média crônica colesteatomatosa. Também utilizaram 21 fragmentos de pele do meato acústico externo, coletados de modo randomizado durante o procedimento cirúrgico de pacientes com e sem colesteatoma como grupo controle. Para a análise desses marcadores os autores empregaram o método ELISA. Foram observados níveis significativamente maiores da IL-1, do TNF- α e do EGF nos fragmentos de pacientes com otite média crônica colesteatomatosa quando comparados aos fragmentos de pacientes com otite média crônica não colesteatomatosa e com os fragmentos de pele do grupo controle. Os autores não encontraram correlação estatisticamente significativa entre os níveis da IL-1, do TNF- α e do EGF e a idade, o gênero e o uso de antibiótico prévio nestes pacientes. Sendo assim, eles concluíram que a destruição óssea observada nos pacientes com colesteatoma é mediada por essas citocinas e pelo EGF.

Alves, Ribeiro (2004), revisando o papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média, observaram uma discordância na literatura em relação à localização do TNF- α , dependendo do trabalho avaliado (todas as camadas do colesteatoma, somente nas camadas suprabasais e no tecido subepitelial, na camada basal e espinhosa ou somente no tecido subepitelial). O TNF- α , segundo os autores, agiria como um mediador do processo de destruição óssea, além de estimular a produção de queratina e aumentar o processo inflamatório.

Vitale, Ribeiro (2007), por meio de uma revisão sistemática da literatura, analisaram o papel do TNF- α na reabsorção óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. Os autores sugeriram que o TNF- α é produzido pelas células presentes no infiltrado inflamatório do tecido conjuntivo subepitelial (perimatriz) e liga-se aos seus receptores que estão localizados no epitélio (matriz)

do colesteatoma, sendo que os receptores do TNF- α poderiam exercer importante função na erosão óssea.

1.1.3 Comparação do TNF-R2 e do TNF-R1 no processo inflamatório

McFarlene et al (2002) compararam a ação do TNF-R1 e do TNF-R2 em seu trabalho. Segundo os autores, os dois receptores possuem estruturas extracelulares análogas, enquanto as porções intracelulares são diferentes, indicando que eles possuem funções biológicas distintas, estando o TNF-R1 relacionado principalmente à citotoxicidade, enquanto o TNF-R2 é mais importante na apoptose ou na proliferação celular. Sabe-se que o TNF- α , após ligar-se aos seus receptores, irá ativar o complexo NF- κ B. Para analisar a eficácia de cada receptor, os autores realizaram cultura de células (a partir de tecido renal, de rabdomyossarcoma e de carcinoma espinocelular cervical humano) e o bloqueio seletivo dos receptores e, posteriormente, avaliaram por meio de eletroforese a degradação da proteína I κ B alfa (inibidora do complexo NF- κ B). Eles observaram que a ativação do NF- κ B era mais significativa quando a ligação do TNF- α era no TNF-R1 em relação ao TNF-R2.

Ramesh, Reeves (2003) realizaram um estudo experimental para analisar a importância dos receptores de TNF- α no processo inflamatório. Os autores estudaram dois grupos de ratos geneticamente modificados. No primeiro grupo, os animais apresentavam uma quantidade menor de TNF-R1, enquanto que, no segundo grupo, os ratos eram deficientes em TNF-R2. Em ambos os grupos foi administrada cisplatina com o intuito de induzir insuficiência renal aguda. Para avaliar a intensidade do processo inflamatório, os autores analisaram, por meio de técnicas imunohistoquímicas, a expressão local do ICAM-1 e do TNF- α , bem como

os níveis séricos deste último. Foi observado que nos ratos do segundo grupo (que tinham mais TNF-R1 em relação ao TNF-R2) a expressão do ICAM-1 e do TNF- α eram menos intensas, quando comparados aos do primeiro grupo. A mesma diferença também foi encontrada em relação aos níveis séricos do TNF- α , que estavam mais elevados no primeiro grupo. Dessa forma, os autores concluíram que o papel do TNF-R2 no processo inflamatório, em animais com insuficiência renal aguda induzida por drogas, foi mais significativo do que o do TNF-R1.

Segundo Grech et al (2005), a principal diferença entre o TNF-R1 e o TNF-R2 é a forma como cada um deles realiza a transdução de sinal (como a célula converte um sinal ou estímulo em outro). O TNF-R1 promoveria a ativação do complexo NF- κ B por meio da proteína de domínio de morte associada ao receptor de TNF (TRADD), enquanto que o TNF-R2 utilizaria os fatores associados aos receptores do TNF (TRAF) existentes no citoplasma celular. Os autores acreditam que os receptores tenham efeitos semelhantes, entretanto comentam que o TRAF possui maior capacidade de ligação por agir diretamente, ao contrário do TRADD. Sendo assim, a interação do TNF- α com o TNF-R2 poderia desencadear um processo inflamatório mais intenso do que a ativação do TNF-R1

2 - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão do receptor tipo dois do fator de necrose tumoral alfa (TNF-R2), empregando técnicas imunohistoquímicas, em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média e relacioná-la com o grau de reabsorção óssea observado durante a cirurgia para sua retirada.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo observacional do tipo transversal aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (projeto n 345/07) (Apêndice).

O material constituiu-se de 70 fragmentos de colesteatomas obtidos de 70 pacientes submetidos à cirurgia otológica para remoção do colesteatoma adquirido da orelha média. As cirurgias foram realizadas no Departamento de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, no período de agosto de 2007 a março de 2009. O diagnóstico da doença foi baseado na história clínica e no exame físico dos pacientes. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados por diferentes otorrinolaringologistas.

Os pacientes receberam um termo de consentimento informado (Apêndices) autorizando a utilização anônima dos dados referentes à história clínica e ao exame físico, bem como a coleta do material durante o procedimento cirúrgico. A não obtenção do termo de consentimento não influenciou o tratamento dos pacientes.

Foram excluídos deste estudo os fragmentos de pacientes que já haviam sido submetidos à cirurgia otológica prévia com manipulação da cadeia ossicular ou das células aéreas mastóideas; pois, nesses casos não foi possível avaliar o grau de erosão óssea. Também foram excluídos os fragmentos que não apresentavam epitélio (matriz) visível à microscopia óptica com a coloração de hematoxilina-eosina (HE); pois, nesses casos, não seria possível detectar a

presença e a expressão dos receptores de TNF- α , já que eles estão presentes na matriz (quadro 1).

Todos os cirurgiões preencheram um protocolo (Anexo 3) no qual informaram o tempo do início dos sintomas, as principais queixas referidas pelos pacientes, a presença de erosão óssea e o local onde este achado foi observado no intra-operatório.

Quadro 1: Organograma com os critérios de inclusão e exclusão dos fragmentos coletados neste trabalho:

Critérios de inclusão		Total
Pacientes submetidos à cirurgia otológica com diagnóstico clínico de colesteatoma	70	70
Critérios de exclusão		37
Cirurgia otológica previa	02	
Ausência de epitélio visível à microscopia óptica	35	
Ausência de dados no protocolo	0	
Total da amostra		33

Após a remoção dos fragmentos de colesteatoma, o material foi fixado em formol a 10% e processado pelas técnicas histológicas habituais com inclusão em parafina. Após a obtenção de cortes de três micrômetros de espessura, por meio de um micrômetro rotativo, foram preparadas as lâminas para o exame histológico

com a coloração de HE, para a verificação da presença ou ausência do epitélio. Quando a matriz estava presente, o caso era incluído no estudo e procedia-se à avaliação histológica e imunohistoquímica.

Para a avaliação histológica foram considerados os padrões de: atrofia (matriz com espessura de no máximo quatro camadas de queratinócitos), acantose (aumento da espessura da matriz à custa da camada espinhosa), hiperplasia da camada basal (aumento do número de camadas de queratinócitos basais), formação de cones epiteliais (invaginações da matriz para o interior da perimatriz) e processo inflamatório presente na perimatriz. Este último padrão só foi possível ser analisado quando a perimatriz foi visualizada à microscopia óptica. A avaliação foi realizada de forma qualitativa (presente ou ausente) e semi-quantitativa, com graduação de 0 a 3 de acordo com a intensidade observada (ausente = 0; fraca = 1; moderada = 2 e severa = 3).

Para a imunohistoquímica, inicialmente, foi promovido o bloqueio da peroxidase endógena e, posteriormente, a recuperação antigênica com citrato (pH 6.0) em panela a vapor. O anticorpo primário utilizado foi o TNF-R2 policlonal sintetizado a partir de ratos (Labvision[®], EUA), na titulação de 1:100 (diluído em BSA e incubado em câmara úmida “overnight” à temperatura de 2 a 8^o Celsius). O anticorpo secundário utilizado foi o Max Polymer Detection System (Kit Novo Link , Novocastra[®], UK).

Foi escolhido o TNF-R2 porque, no início da elaboração do protocolo do presente estudo, não havia disponibilidade de se avaliar a expressão do TNF-R1 em tecidos armazenados em blocos de parafina. Os kits disponíveis para a

pesquisa do TNF-R1 eram exclusivamente para fragmentos armazenados por meio de congelação, impossibilitando a realização do exame em nosso serviço.

A avaliação imunohistoquímica foi realizada de forma qualitativa (presente ou ausente) e semi-quantitativa, com graduação de 0 a 3, de acordo com a intensidade da coloração observada: ausente = 0; fraca = 1 (figuras 1 e 2); moderada = 2 (figuras 3 e 4) e severa = 3 (figuras 5 e 6).

As lâminas com fragmentos de colesteatoma foram analisadas com um microscópio óptico modelo Axioscope 40 (Carl Zeiss do Brasil), com ocular de 10X e objetiva de 10X, 20X e 40X, tanto para avaliação histológica quanto para a imunohistoquímica. Todas as lâminas foram avaliadas por três observadores independentes (duas professoras do Departamento de Morfologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e o próprio pesquisador), de maneira cega. O microscópio estava acoplado a uma câmera AxioCam MRc 5 (Zeiss) para a obtenção das imagens digitais do material, utilizando o software Axiovision 4.8.

Após a coleta de dados foi montado um banco informatizado, que foi submetido à análise estatística com o auxílio do programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versão 13.0.

Realizou-se análise descritiva com cálculos de valores mínimos e máximos, média, mediana e desvio-padrão para a variável idade e tempo de doença, e cálculos de frequências absolutas e relativas para o gênero, orelha acometida, ossículos erodidos e para as variáveis histopatológicas e imunohistoquímicas.

Para a associação entre as variáveis qualitativas foi utilizado o teste exato de Fisher. Para verificar a existência de correlações entre as variáveis quantitativas utilizou-se o Coeficiente de Spearman.

Todos os testes foram realizados na forma bicaudal e admitindo-se nível de significância de 5%.

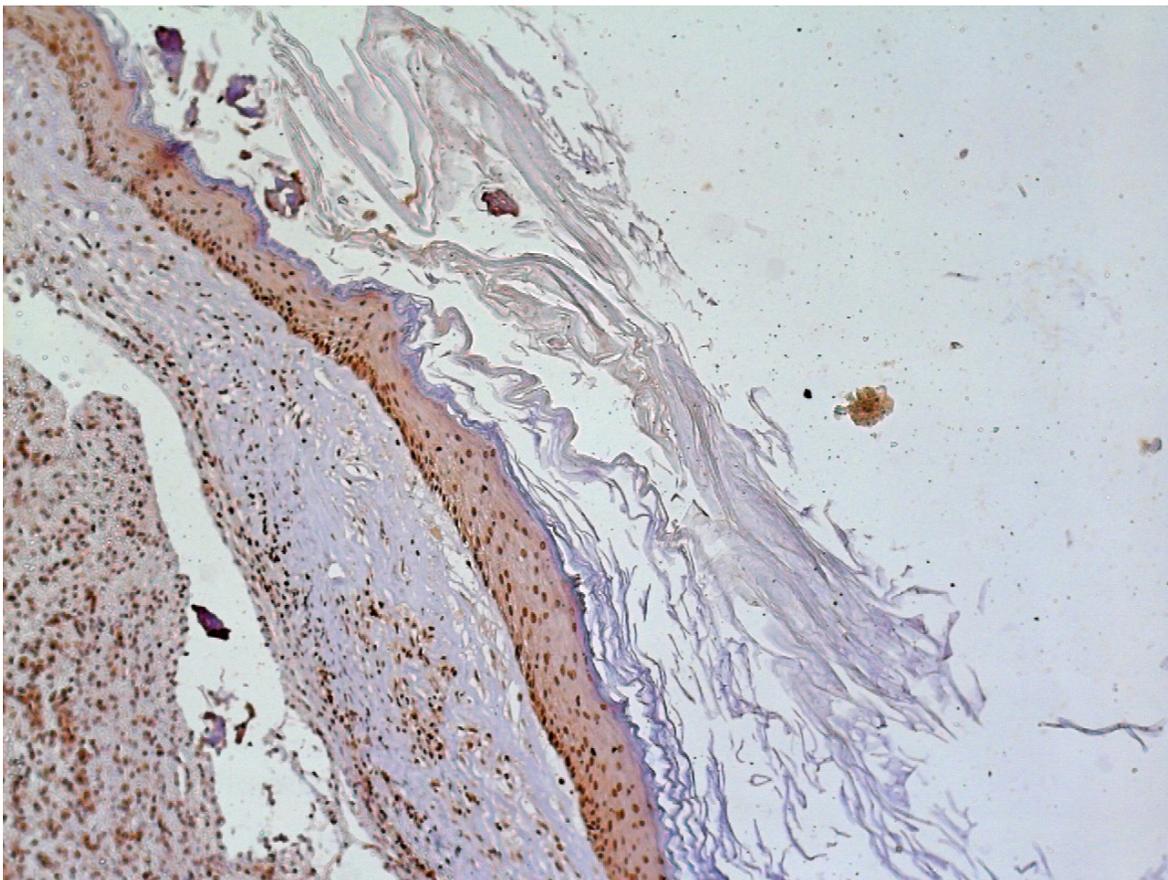


Figura 1: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação fraca ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X100).

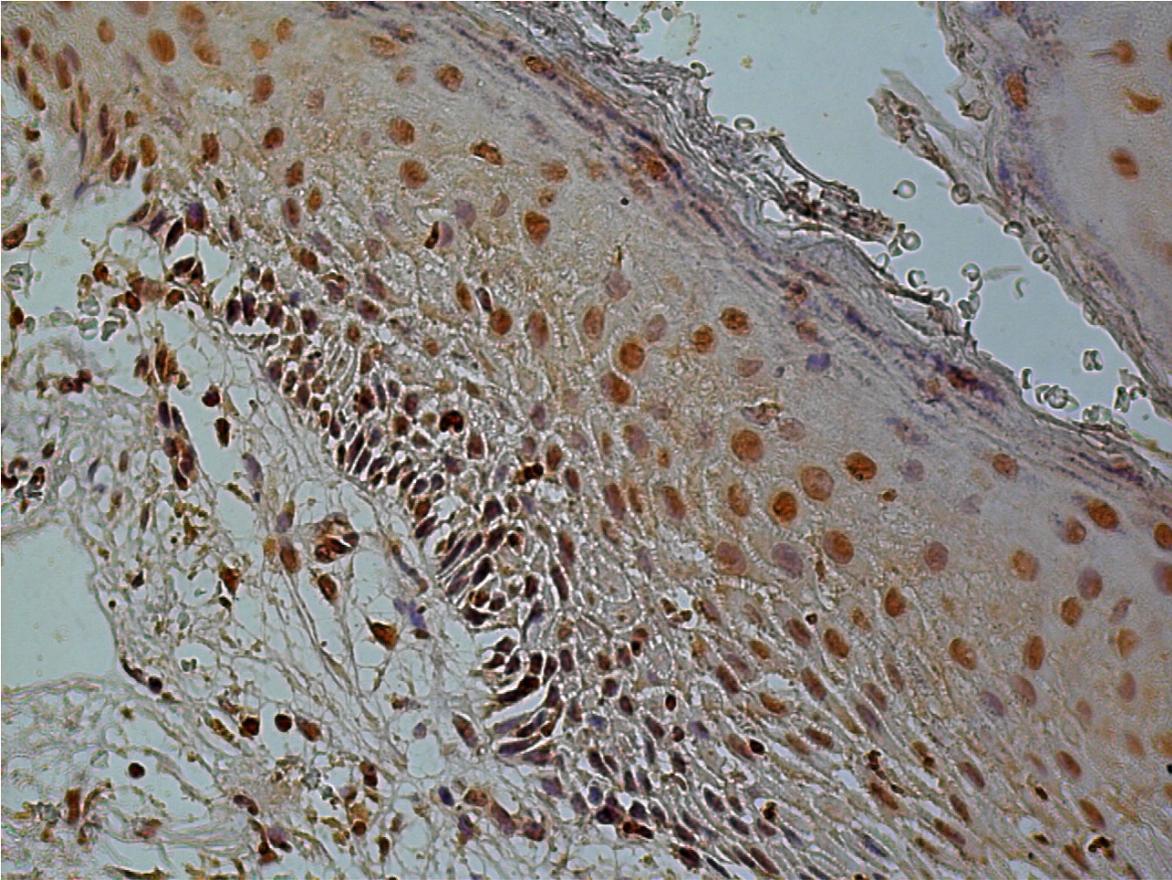


Figura 2: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação fraca ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

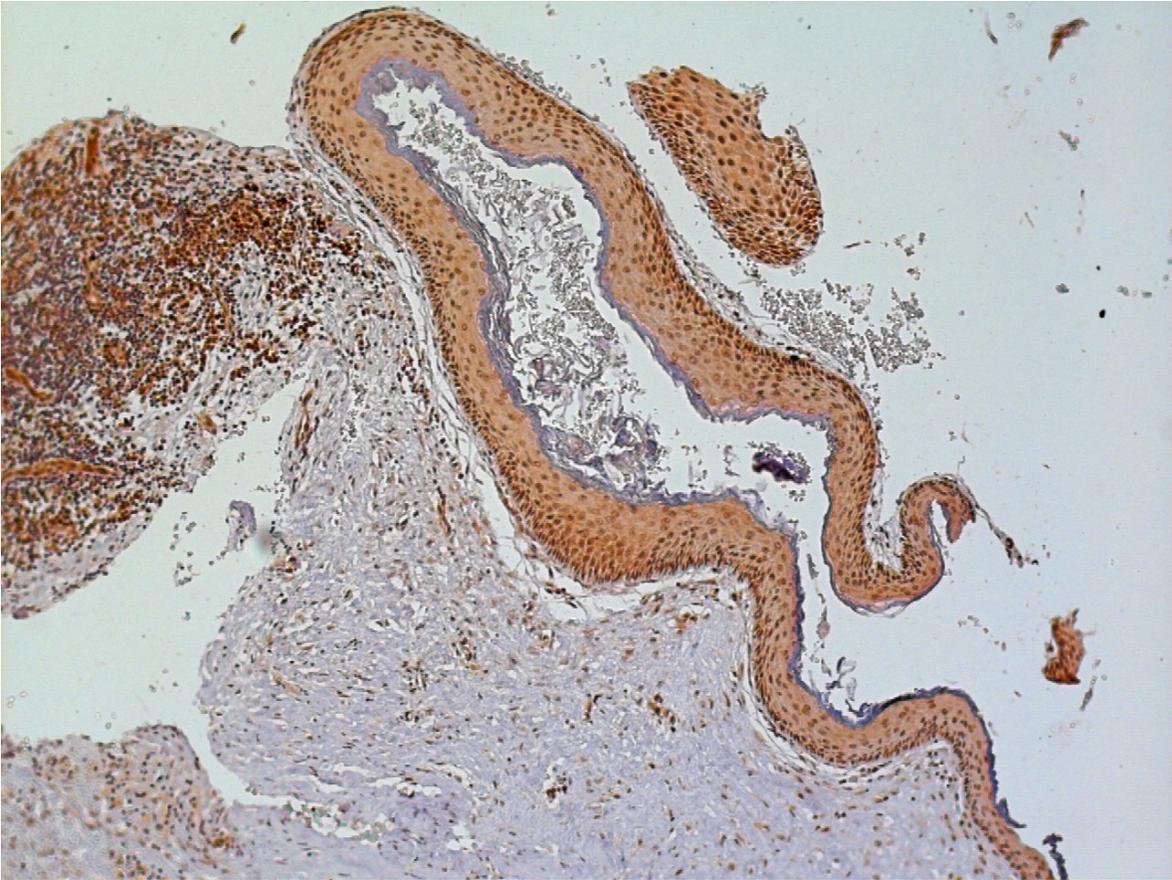


Figura 3: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação moderada ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHC X100).

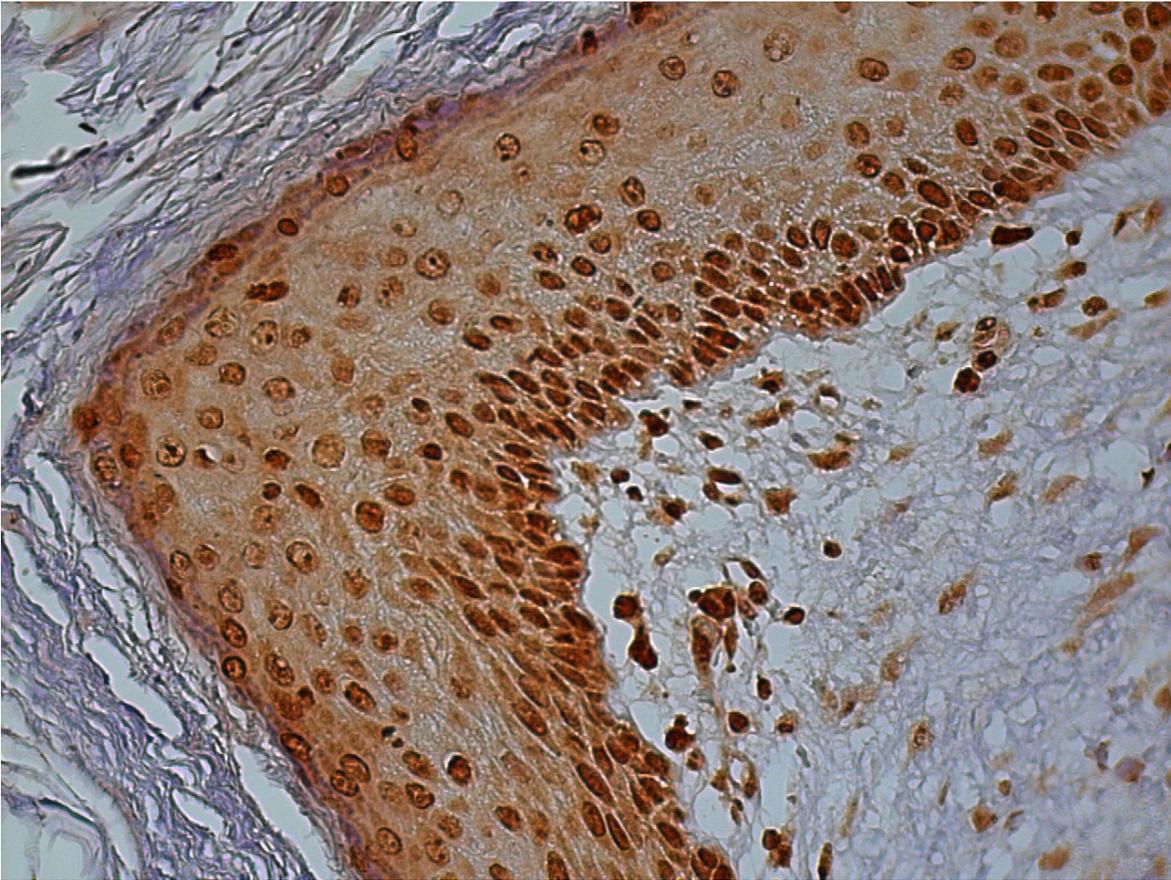


Figura 4: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação moderada ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

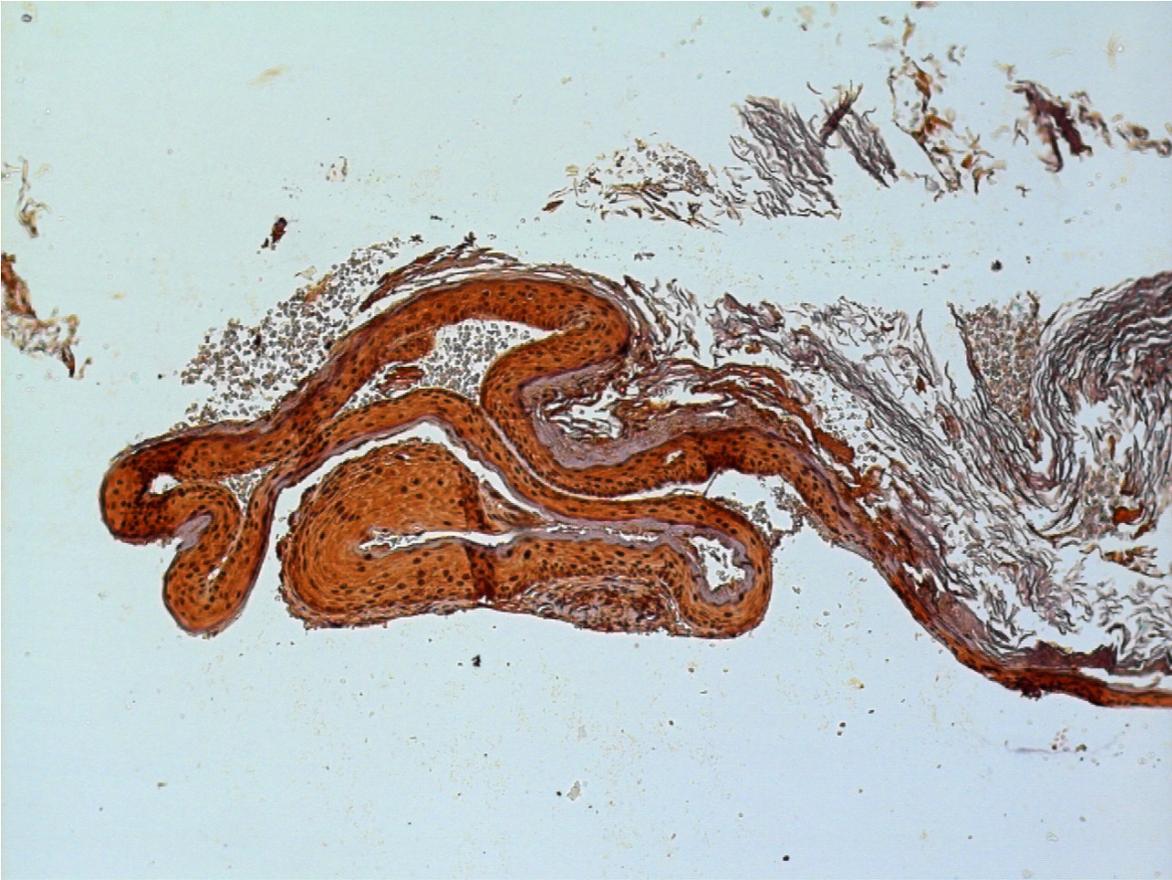


Figura 5: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação severa ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X100).

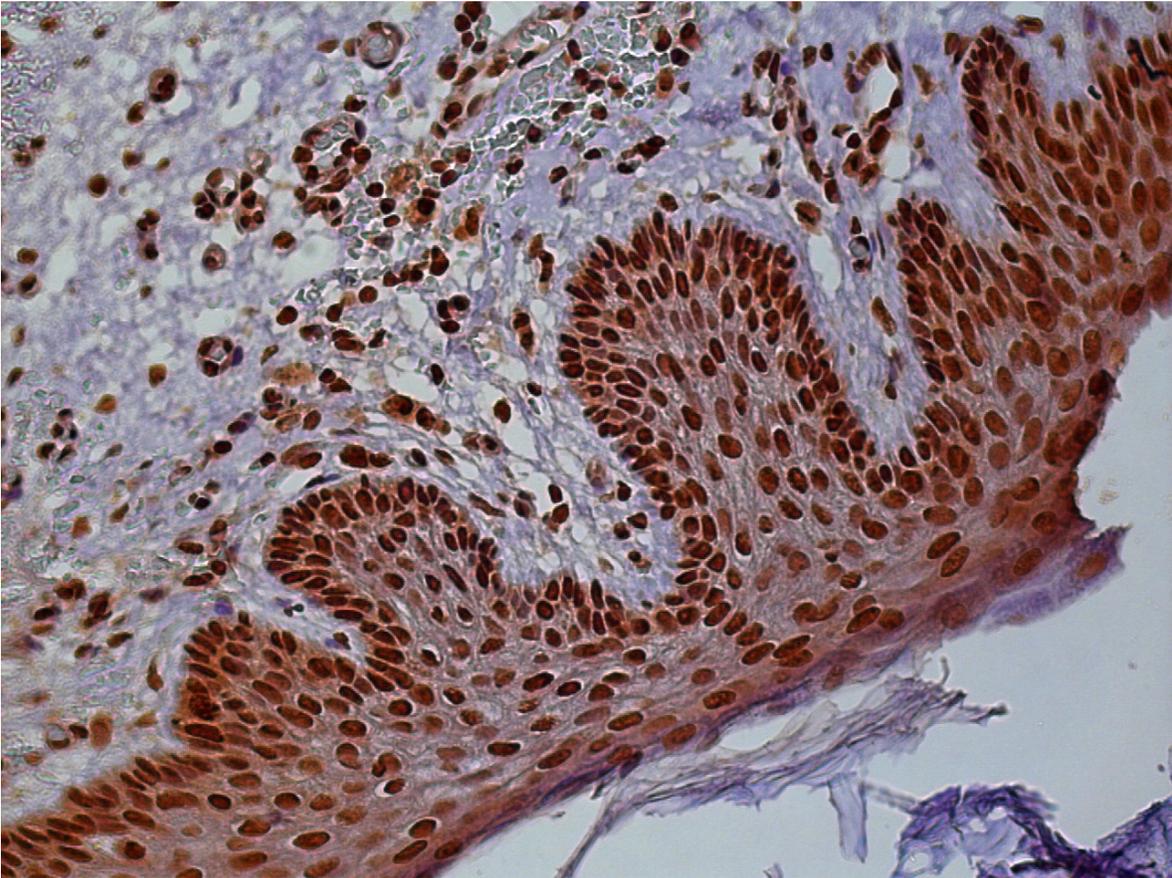


Figura 6: Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação severa ao anticorpo TNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz (IHQ X400).

4 - RESULTADOS

Foram analisados 33 fragmentos de colesteatoma de 33 pacientes submetidos à cirurgia otológica, sendo 17 deles (51,5%) do gênero masculino e 16 (48,5%) do gênero feminino. A idade mínima foi de sete anos e a máxima de 70, com média de 30 anos, mediana de 31 anos e desvio-padrão de 16,4. Dos 33 pacientes incluídos no estudo, dois (6,1%) não sabiam referir o tempo decorrido desde o início dos sintomas até a admissão no Departamento de Otorrinolaringologia e a marcação da cirurgia. Dos 31 pacientes que informaram este dado, 13 referiram período de menos de cinco anos de doença (41,9%), sete mencionaram período entre seis e dez anos (22,6%), nove citaram período entre 11 e 20 anos (29%) e, em apenas dois pacientes, o tempo excedeu 20 anos (6,5%). O tempo decorrido desde o início dos sintomas até a admissão no Departamento de Otorrinolaringologia variou de um a 60 anos, com média de 11,5, mediana de oito anos e desvio-padrão de 11,6.

Em relação à orelha acometida pela doença, quatro pacientes (12,1%) apresentavam otite média crônica colesteatomatosa em ambas as orelhas e 29 (87,9%) tinham acometimento unilateral, sendo 15 (45,5%) em orelha direita e 14 (42,4%) em orelha esquerda.

Em relação aos sintomas clínicos referidos pelos pacientes na admissão, 31 (93,9%) relataram otorréia, 30 (90,9%) mencionaram hipoacusia e 27 (81,8%), episódios de tontura.

Em relação ao comprometimento da cadeia ossicular, 28 pacientes (84,8%) apresentavam erosão em algum dos ossículos e, em cinco (15,2%), não foi

evidenciado comprometimento da cadeia na avaliação intra-operatória. Dos 28 pacientes, que apresentavam erosão da cadeia ossicular, seis (21,4%) tinham erosão em apenas um ossículo, oito (28,6%) apresentavam dois ossículos erodidos e, em 14 (50%), o comprometimento ocorreu nos três ossículos.

Em relação ao ossículo acometido, 23 pacientes (69,7%) tiveram erosão do martelo, 23 (69,7%), da bigorna e 18 (54,5%), do estribo.

Além do comprometimento da cadeia ossicular, observou-se a presença de erosão do canal semicircular, exposição do nervo facial e da dura-máter. Houve erosão do canal semicircular em três pacientes (9,1%), exposição do nervo facial em seis (18,2%) e da dura-máter em cinco (15,2%).

Na tabela 1 estão representados os achados em relação à erosão da cadeia ossicular, do canal semicircular, e a exposição do nervo facial e da dura-máter observados no intra-operatório.

Tabela 1: Erosão óssea observada no intra-operatório de pacientes submetidos à cirurgia para remoção do colesteatoma adquirido da orelha média.

	presente	porcentagem	ausente	porcentagem
Bigorna	23	69,7%	10	30,3%
Martelo	23	69,7%	10	30,3%
Estribo	18	54,5%	15	45,5%
Canal semicircular	03	9,1	30	90,9%
Exposição do nervo facial	06	18,2%	27	81,8%
Exposição da meninge	05	15,2%	28	84,8%

A avaliação histológica evidenciou a presença de mais de um padrão histopatológico (atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e presença de cones epiteliais) simultaneamente na maioria dos fragmentos de colesteatoma analisados.

A atrofia estava presente em 21 fragmentos (63,6%), sendo que em 13 (39,4%) foram observados apenas focos de atrofia e, em oito (24,2%), houve predomínio desta variável. Em 12 casos (36,4%) não foram observadas áreas de atrofia na matriz (figura 7).

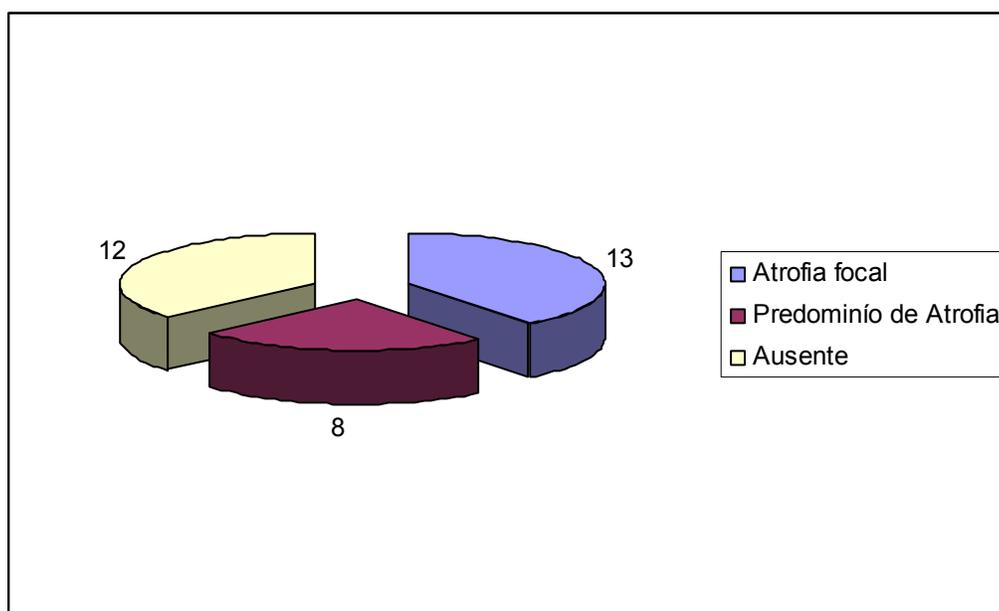


Figura 7: Distribuição da atrofia nos 33 fragmentos de colesteatomas analisados

Em relação à acantose, ela estava ausente em três fragmentos (9,1%), presente em intensidade fraca em dez (30,3%), moderada em 16 (48,5%) e acentuada em quatro (12,1%) (figura 8).

Quando se analisou a variável hiperplasia da camada basal, em três casos (9,1%) ela foi acentuada, em 15 (45,5%), moderada, em 13 (39,4%), fraca e, em dois casos (6%), ausente (figura 8).

Em relação à presença dos cones epiteliais, em três casos (9,1%) esta variável estava presente em intensidade acentuada, em seis (18,2%), moderada, em 12 (36,4%), fraca e, em 12 casos (36,4%), esta variável estava ausente (figura 8).

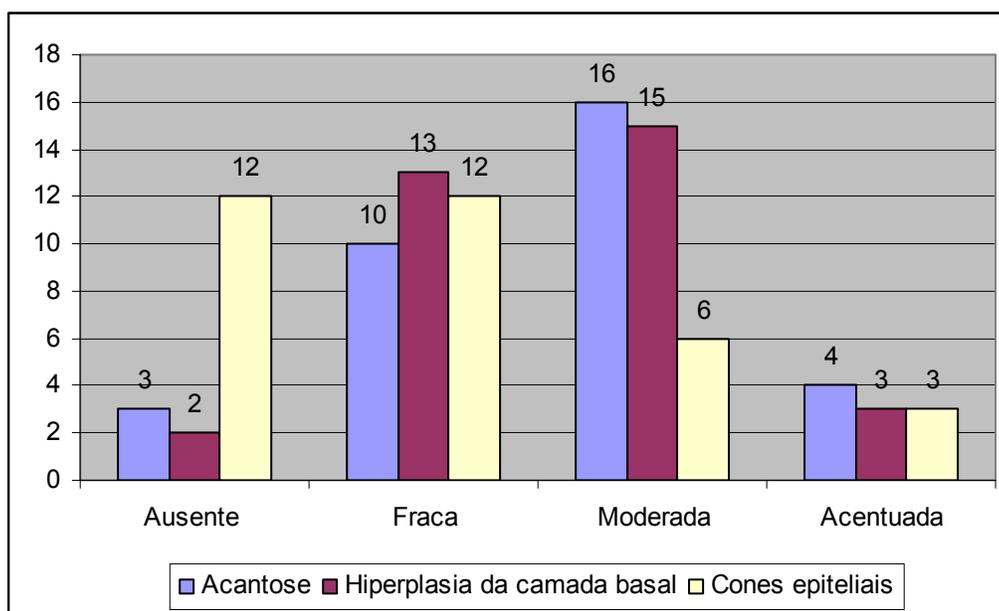


Figura 8: Distribuição da acantose, hiperplasia da camada basal e formação de cones epiteliais nos fragmentos de colesteatomas analisados.

Devido à ausência de perimatriz em um dos 33 fragmentos estudados, não foi possível avaliar a intensidade da inflamação nesse caso. Dos 32 casos restantes, a inflamação estava ausente em um (3,1%), fraca em 14 (43,8%), moderada em 13 (40,6%) e acentuada em quatro (12,5%). O infiltrado

inflamatório foi predominantemente linfoplasmocitário, com áreas de neovascularização.

Na avaliação imunohistoquímica, foi observada a reação do anticorpo anti-TNF-R2 nas células da matriz em todos os fragmentos de colesteatomas analisados. Essa reação foi considerada fraca em 10 casos (30,3%), moderada em 18 (54,5%) e acentuada em cinco (15,2%) (Figura 9). Além da reação citoplasmática, foi observada reação em quase todos os núcleos dos queratinócitos da matriz dos fragmentos analisados e também em núcleos das células inflamatórias da perimatriz.

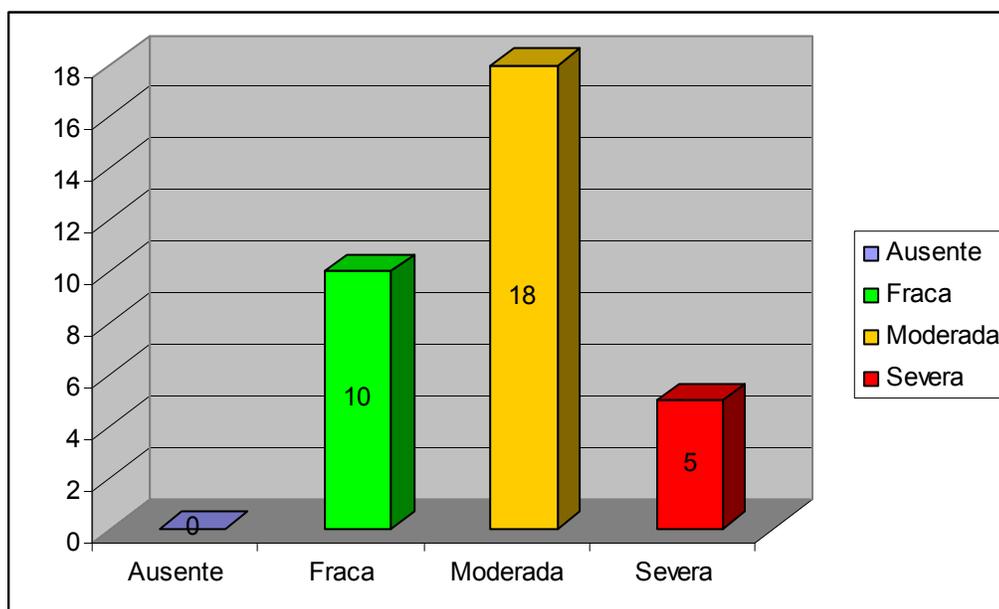


Figura 9: Distribuição do TNF-R2 nos fragmentos de colesteatoma analisados.

A análise estatística não evidenciou associação, estatisticamente significativa, entre as variáveis quantitativas e a presença do TNF-R2. Também

não foi demonstrada correlação positiva e estatisticamente significativa, pelo índice de correlação de Spearman, entre as variáveis relacionadas à erosão óssea e à expressão do TNF-R2.

5 - DISCUSSÃO

O colesteatoma adquirido da orelha média é uma doença caracterizada pela invasão da cavidade timpânica por um epitélio (matriz) diferente do encontrado habitualmente dentro da orelha média. Histologicamente, este epitélio é semelhante à pele fina normal, apresentando as camadas basal, espinhosa, granulosa e córnea.

A análise histológica demonstrou que a matriz pode apresentar diferentes padrões histopatológicos como atrofia, acantose, hiperplasia da camada basal e formação de cones epiteliais. Esses padrões frequentemente coexistem em um mesmo fragmento, como demonstrado no presente estudo. Esses achados histológicos estão de acordo com Pereira (2001) e Alves et al (2008). Pereira (2001) também observou correlações positivas e significativas entre variáveis histopatológicas (hiperplasia da camada basal com cones epiteliais e acantose) e imunohistoquímicas (presença de Ki-67 suprabasal e CK16 suprabasal), verificando que a presença dessas variáveis histopatológicas está relacionada à proliferação dos queratinócitos.

A avaliação da perimatriz dos fragmentos de colesteatomas evidenciou a presença de processo inflamatório em 96,9% dos casos, em diferentes intensidades. Este fato está de acordo com Pereira (2001) e Alves et al (2008), que observaram infiltrado inflamatório na perimatriz em 90,9% e 96,0%, respectivamente. Esses resultados são compatíveis com a história clínica do colesteatoma adquirido da orelha média, visto ser uma doença crônica que cursa, na maioria das vezes, com processo inflamatório e infeccioso intenso. Essa

reação inflamatória e infecciosa estaria relacionada à erosão óssea e às complicações promovidas por essa doença (Amar et al, 1996).

Frequentemente o colesteatoma causa erosão da cadeia ossicular. No presente estudo, durante o ato cirúrgico, a cadeia ossicular estava erodida em 84,4% dos pacientes. Estes dados corroboram os observados por Dornelles et al (2007), que encontraram erosão da cadeia ossicular em 91,5% dos pacientes. Segundo esses autores, a bigorna seria o ossículo mais acometido no início da doença. Posteriormente, ocorreria a erosão do estribo e do martelo. Esses dados são semelhantes aos relatados por Tos (1979).

No presente estudo, os ossículos mais acometidos foram a bigorna, especialmente a sua apófise longa, e o martelo, ambos em 23 pacientes (69,7%). A erosão do estribo ocorreu em 18 pacientes (54,5%). Esses achados diferem de Tos (1979) e Dornelles et al (2007), que observaram a erosão da bigorna como a mais frequente, seguida do estribo e, posteriormente, do martelo. Os trabalhos de Tos (1979) e Dornelles et al (2007) tiveram como objetivo o estudo da erosão óssea, promovida pelo colesteatoma, e incluíram, em sua casuística, todos os casos operados pela doença. O presente estudo teve como objetivo o estudo de um receptor que está presente na matriz dos colesteatomas, logo, só os casos com epitélio visível à microscopia óptica foram incluídos no estudo. Aqueles pacientes cujos fragmentos não apresentavam matriz foram descartados. Isso, talvez, explique a diferença encontrada em relação à erosão da cadeia ossicular.

Além do acometimento da cadeia ossicular, observou-se erosão do canal semicircular lateral em três pacientes (9,1%), a exposição do nervo facial em seis (18,2%) e da meninge em cinco (15,2%). Sabe-se que a erosão óssea favorece a

propagação do processo inflamatório e infeccioso, acarretando complicações (como a paralisia facial periférica, o abscesso cerebral e a meningite otogênica, entre outras) que possuem altas taxas de mortalidade e morbidade (Lessa et al, 2003).

O colesteatoma adquirido da orelha média é uma doença que cursa com intenso processo inflamatório e infeccioso. Essa situação induz a produção e liberação de diferentes substâncias (citocinas e fatores de crescimento) que agem concomitantemente e em sinergismo, resultando nas características agressivas do colesteatoma (Alves, Ribeiro, 2004). Entre estas substâncias destacam-se as interleucinas 1, 6 e 8, o TGF- α , o TGF- β , o EGF, o KGF e, principalmente, o TNF- α , que é considerada uma das principais citocinas envolvidas nos processos inflamatórios e imunes (Abbas et al, 1998).

Yan, Huang, (1991) foram os primeiros autores a relacionar o TNF- α à destruição óssea observada nos pacientes com colesteatoma. Segundo Yetiser (2002), a elevada expressão desta citocina é o que diferencia a otite média crônica colesteatomatosa da otite média crônica simples quanto à capacidade de causar erosão óssea.

Amar et al (1996) e Akimoto et al (2000), além de confirmarem a importância do TNF- α na lise óssea, procuraram correlacionar a destruição da cadeia ossicular com a expressão local do TNF- α . Segundo esses autores, quanto mais intenso o processo inflamatório, maior seria a produção e liberação do TNF- α ; e, quanto maior a expressão do TNF- α , maior seria a destruição óssea observada. Sastry et al (1999) notaram o aumento na expressão do TNF- α localmente e de forma sistêmica, correlacionando a concentração plasmática de

TNF- α e a intensidade da erosão da cadeia ossicular promovida pelo colesteatoma.

O colesteatoma adquirido da orelha média tem um comportamento distinto quanto à capacidade de causar lise óssea; e, ainda não se conhecem totalmente os mecanismos pelos quais isso ocorre. Portanto, para que se entendam as diferenças de comportamento entre os colesteatomas em relação à agressividade, é preciso avaliar também a interação entre as citocinas e seus receptores e o processo intracelular desencadeado por essa ligação (Vitale, Ribeiro, 2007), já que as reações citoplasmáticas e nucleares responsáveis pelos efeitos biológicos dessas citocinas são complexas. Em relação a algumas citocinas e fatores de crescimento, as reações citoplasmáticas e nucleares resultantes da interação citocina-receptor ainda não foram avaliadas em colesteatomas adquiridos da orelha média.

Chung, Yoon (1998) demonstraram que, quando se separa o tecido epitelial do colesteatoma do tecido subepitelial, a produção de citocinas (IL-1 e IL-8) vai reduzindo até cessar. Isso evidencia a interação da matriz com a perimatriz, que ocorre no colesteatoma adquirido da orelha média, na qual as citocinas são produzidas na perimatriz e agem em seus receptores localizados na matriz (Alves e Ribeiro, 2004).

Existem dois receptores para o TNF- α : o TNF-R1 e o TNF-R2. O papel de cada um dos receptores do TNF- α não é totalmente conhecido. Alguns autores, como Bingham (2002) e McFarlane et al (2002), acreditam que o TNF-R1 seria mais importante; enquanto, Ramesh, Reeves (2003) e Grech et al (2005) observaram em seus trabalhos uma maior ação do TNF-R2 no processo

inflamatório. Esses trabalhos testaram os receptores do TNF- α em tecido renal, em cultura de células obtidas de rhabdomyosarcoma e de carcinoma espinocelular, bem como em ratos geneticamente modificados. A comparação entre estes trabalhos é difícil, pois os autores utilizaram métodos diferentes para avaliar a função de cada receptor. Isso ocorre porque o estudo desses receptores é recente, não existindo ainda uma padronização para a avaliação dos mesmos.

O intuito do presente estudo foi verificar a expressão do TNF-R2 por meio de técnicas imunohistoquímicas, em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média, e correlacioná-la à destruição óssea observada no intra-operatório dos pacientes incluídos na pesquisa. Como já foi demonstrado que a expressão local do TNF- α está associada à erosão promovida pelo colesteatoma, faz-se necessária essa avaliação para verificar se a quantidade de receptores também interfere no grau de reabsorção óssea, visto que o TNF- α só irá promover o seu efeito biológico após ligar-se aos seus receptores (Bingham, 2002).

Após a síntese do TNF- α pelos macrófagos, linfócitos e monócitos do infiltrado inflamatório presente na perimatriz, ele liga-se aos seus receptores (transmembrânicos) localizados nos queratinócitos da matriz, para que possa exercer seu efeito biológico (Abbas et al 1998). A ligação entre o TNF- α e seu receptor promove uma reação em cadeia no citoplasma celular, que acarretará a ativação do complexo NF- κ B e sua ação no núcleo celular.

No presente estudo, avaliou-se a expressão do TNF-R2, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em fragmentos de colesteatomas adquiridos da orelha média. A reação ao TNF-R2 foi citoplasmática e ocorreu em todos os

queratinócitos da matriz dos fragmentos analisados. Também ocorreu reação em algumas células inflamatórias da perimatriz (linfócitos e plasmócitos). Além da expressão do TNF-R2, foi observada a erosão óssea presente durante o procedimento cirúrgico. Para isso, foi avaliada a presença de erosão da cadeia ossicular, do canal semicircular e a exposição do nervo facial e da meninge.

Realizou-se análise estatística, para verificar se havia associação ou correlação entre a expressão do TNF-R2 e o grau de agressividade do colesteatoma, medida pela extensão da erosão óssea. Entretanto, no presente estudo, não se evidenciou o envolvimento do TNF-R2 no processo de erosão óssea promovido pelo colesteatoma. Ou seja, o receptor do TNF- α está presente no colesteatoma adquirido da orelha média, porém a sua expressão (quantidade de receptor) não interfere no processo de reabsorção óssea.

Desta forma, é importante que se estude futuramente o que ocorre após a ligação entre o TNF- α e o seu receptor e verificar se existe alguma substância presente no citoplasma ou no núcleo da célula que possa estar relacionada à erosão óssea e, com isso, explicar a diferença de agressividade existente entre os colesteatomas. Caso contrário, a gravidade da doença estaria relacionada somente à intensidade do processo inflamatório e, portanto, à quantidade de TNF- α liberado (conjuntamente com outras citocinas) como relataram Amar et al (1996) e Akimoto et al (2000). Essas citocinas, após a ligação com seus respectivos receptores, estimulariam a proliferação do epitélio do colesteatoma, propiciando maior acúmulo de debris de queratina e agravamento do quadro infeccioso e inflamatório, gerando um círculo vicioso.

No presente trabalho, além da reação citoplasmática (padrão) decorrente da ligação entre o TNF- α e o TNF-R2, também foi detectada uma expressão nuclear significativa em todas as lâminas avaliadas, em células epiteliais da matriz e em algumas células do infiltrado inflamatório da perimatriz (linfócitos e plasmócitos) (Anexo 4). Essa reação não foi descrita em trabalhos anteriores, mas se sabe que, após a ligação do TNF- α ao seu receptor, ocorre uma reação inicialmente citoplasmática e, posteriormente, nuclear, para que o TNF- α promova seu efeito biológico e, conseqüentemente, cause a reabsorção óssea observada no colesteatoma adquirido da orelha média (como verificado no anexo 5). Sendo assim, a expressão nuclear poderia indicar uma reação intensa que ocorreria no colesteatoma.

Outra possibilidade seria a presença de uma reação cruzada com alguma proteína presente no núcleo, que tenha uma conformação e uma sequência de aminoácidos semelhante à porção do receptor do TNF- α no qual o anticorpo anti-TNF-R2 se ligaria. Essa reação cruzada (quando presente) pode ter algum significado clínico. Fato semelhante ocorre com a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER-2) no câncer de tireóide.

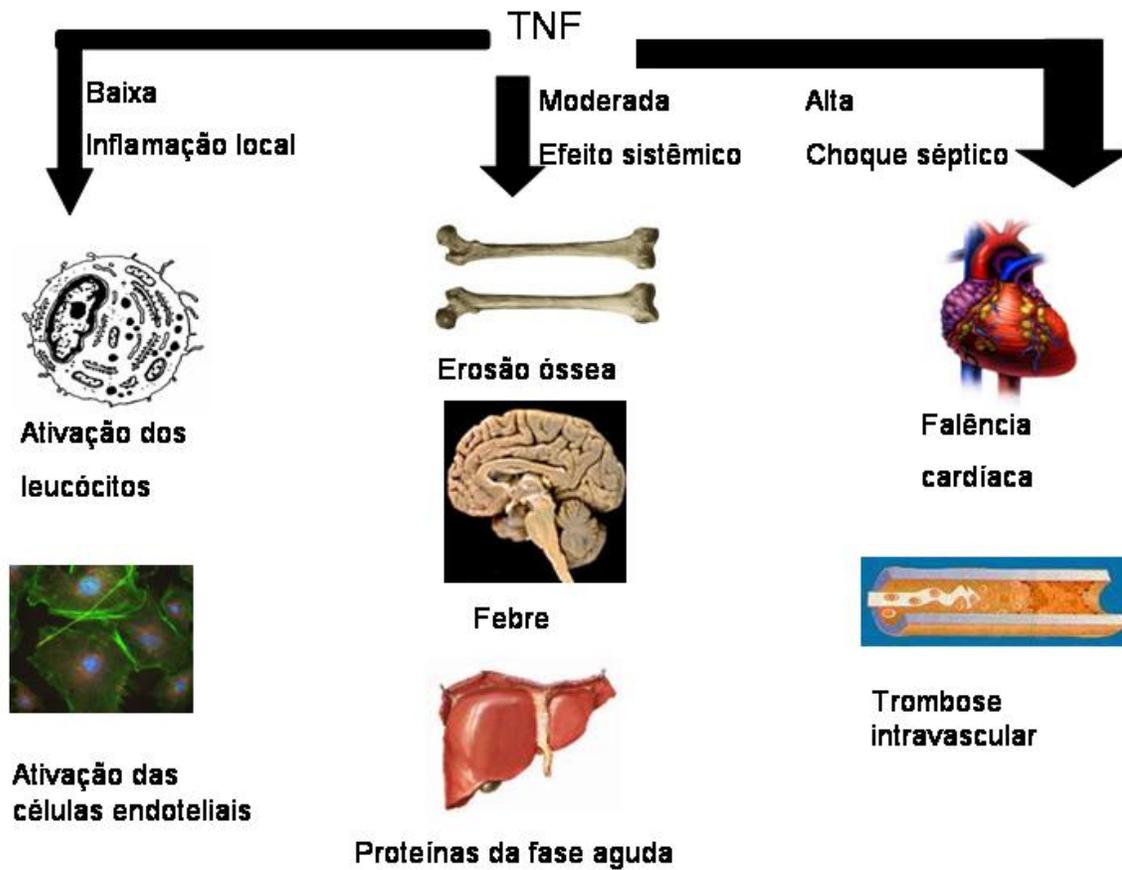
Essa expressão nuclear precisa ser mais bem elucidada, com novos trabalhos, no futuro, verificando não só a expressão do TNF-R2 como também do TNF-R1, conjuntamente com a expressão do TNF- α no colesteatoma adquirido da orelha média.

6 - CONCLUSÕES

- 1) O TNF-R2 está presente na matriz dos colesteatomas adquiridos da orelha média.
- 2) Não foi possível correlacionar a expressão do TNF-R2 com o grau de erosão óssea observado durante as cirurgias dos pacientes operados por colesteatoma adquirido da orelha média.
- 3) Foi observada reação nuclear, nos queratinócitos da matriz dos colesteatomas adquiridos da orelha media, à reação com o anticorpo anti-TNF-R2.

7 - ANEXOS

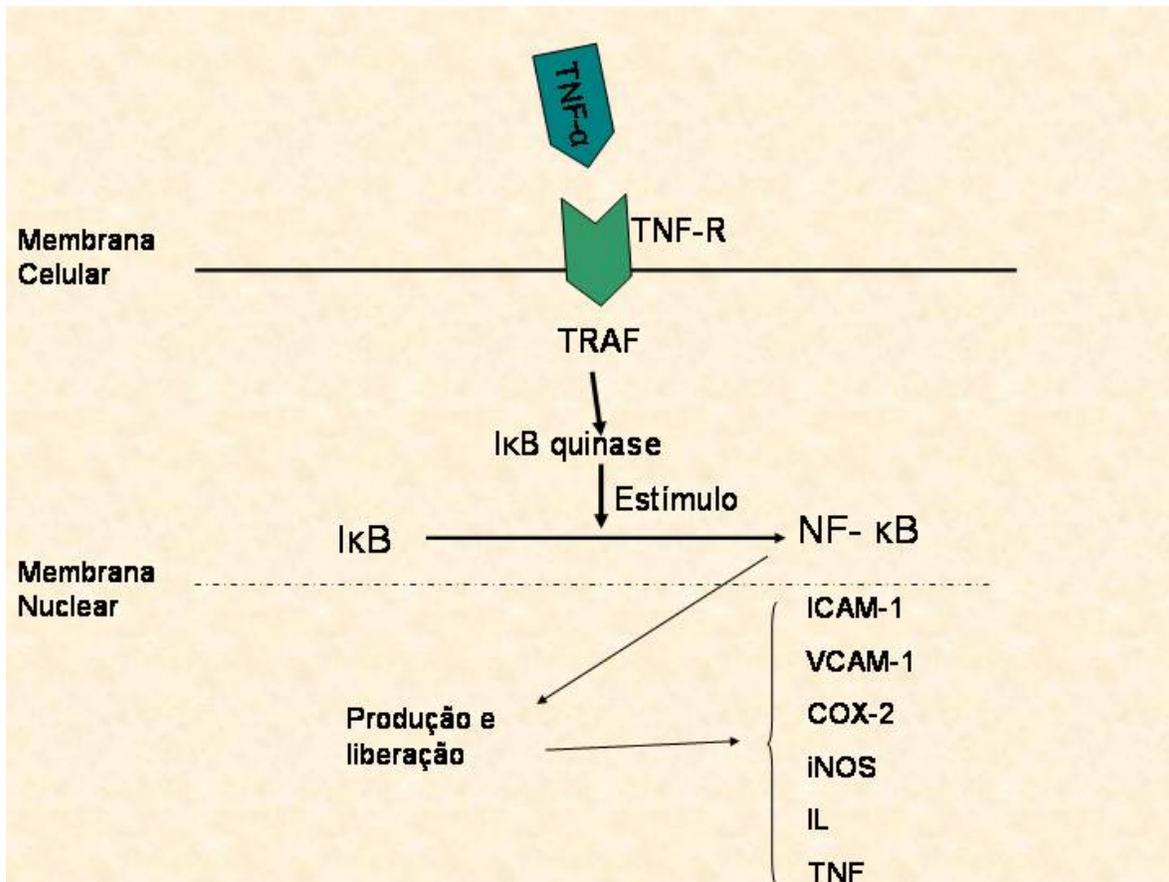
7.1 ANEXO 1



Principais efeitos do TNF- α no organismo, dependendo da quantidade produzida

Baseado em Abbas et al (1998)

7.2 ANEXO 2



Ação do TNF- α na célula. Após ligar-se ao seu receptor, ele estimula a ativação do NF- κ B, que promove a produção e liberação de diversas substâncias envolvidas no processo inflamatório e imune

7.3 ANEXO 3

Protocolo Colesteatoma

Caso Nº _____

Prontuário _____

Nome _____ Sexo _____ Idade _____

Supuração () OD há _____ Perda auditiva () OD Tonturas () Sim
() OE há _____ () OE () Não

Audiometria Normal _____ DSN _____ Condutiva _____ Mista _____

Tomografia

Colesteatoma

Orelha Média _____ Mastóide _____ Outra _____

Cadeia Ossicular

Íntegra ()

Erosão () Martelo () Bigorna () Estribo ()

Erosão do Canal Semicircular _____

Nervo facial Exposto () Sim

() Não

Exposição da Meninge () Sim

() Não

Erosão da Cortical () Sim

() Não

Cirurgia prévia : Data _____ Ouvido _____ Meningite () Mastoidite ()

ACHADOS INTRA – OPERATÓRIOS

Colesteatoma

Orelha Média _____ Mastóide _____ Outra _____

Cadeia Ossicular

Íntegra ()

Erosão () Martelo () Bigorna () Estribo ()

Erosão do Canal Semicircular _____

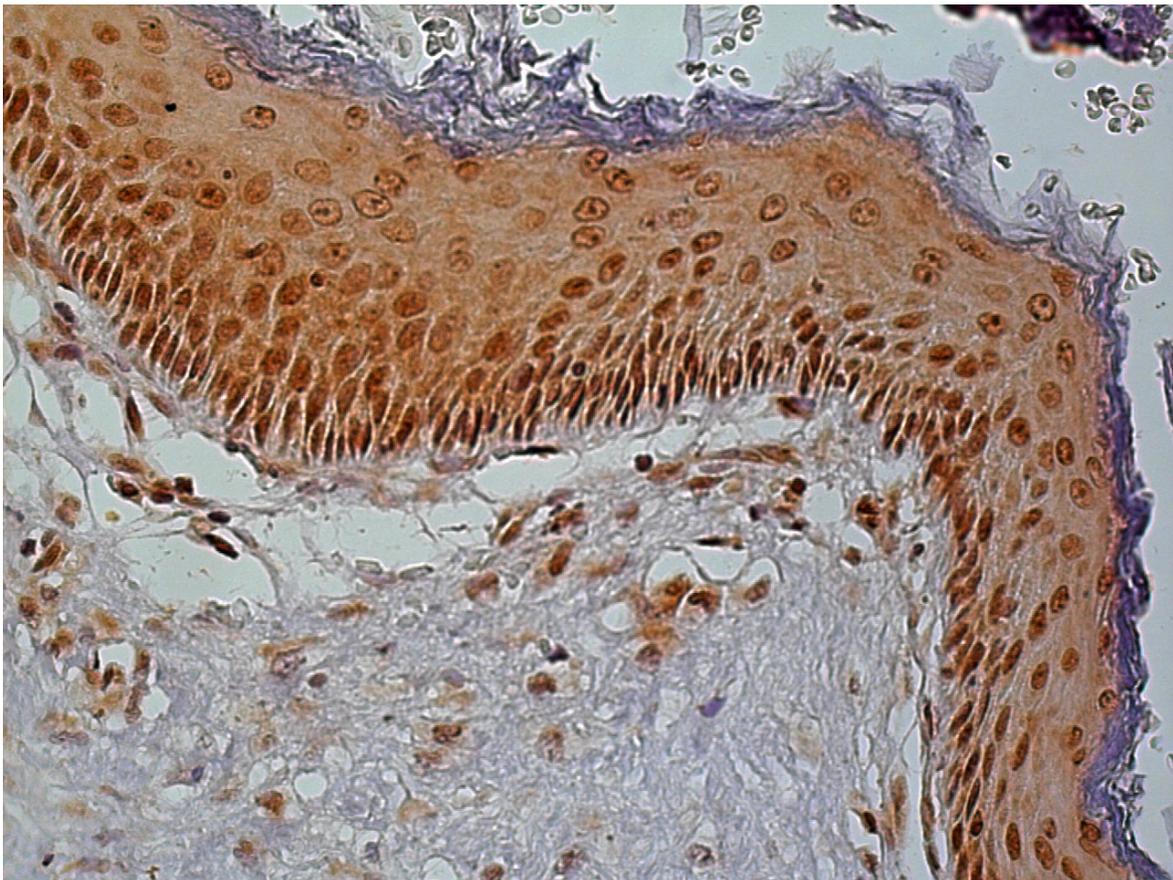
Nervo facial Exposto () Sim

() Não

Exposição da Meninge () Sim

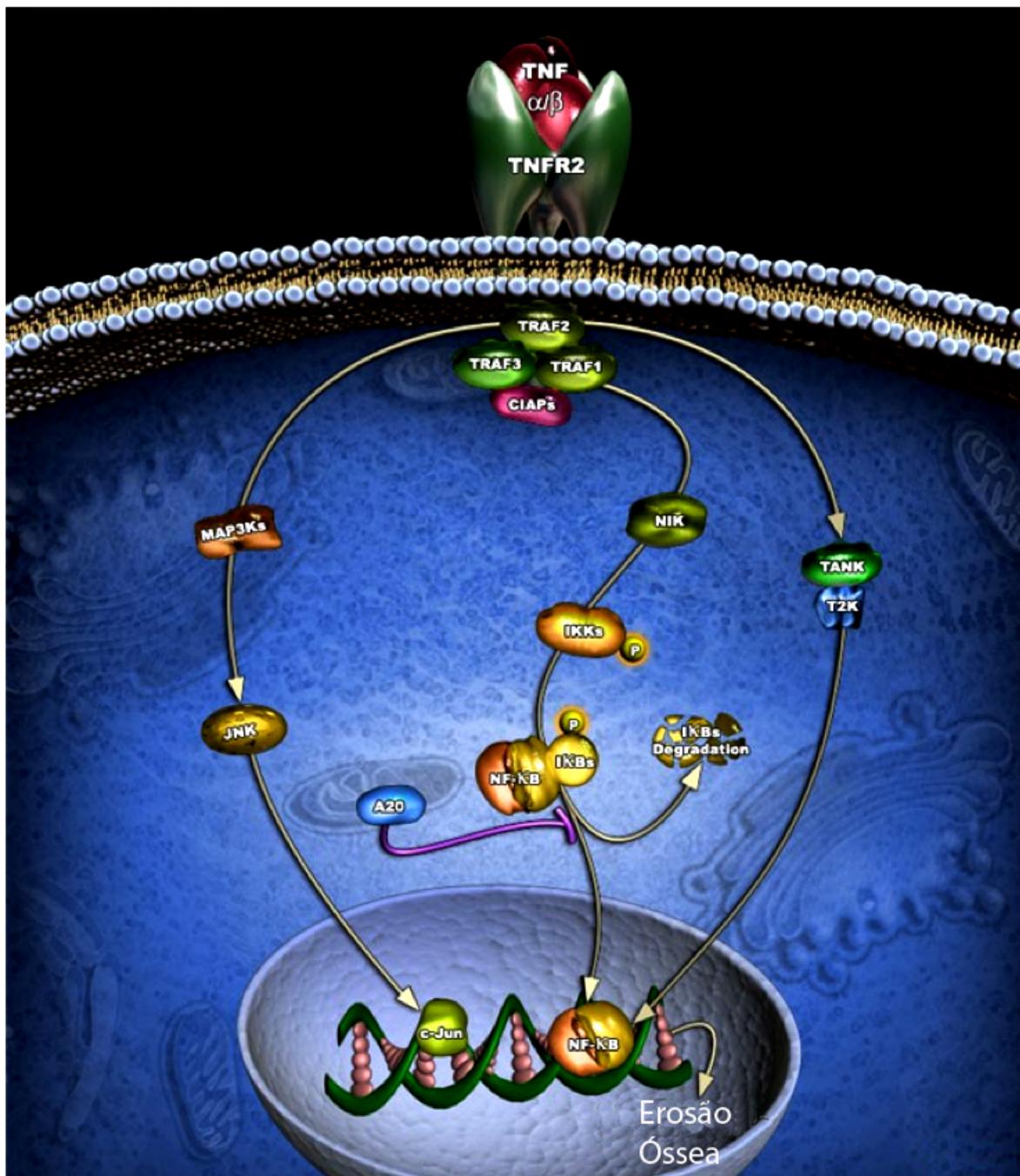
() Não

7.4 ANEXO 4



Fotomicrografia de fragmento de colesteatoma onde se observa reação ao anticorpoTNF-R2 no citoplasma dos queratinócitos da matriz e em algumas células da perimatriz do colesteatoma (IHQ X400).

7.5 ANEXO 5



Reação citoplasmática, após a ligação do TNF- α ao seu receptor tipo dois, promovendo a reabsorção óssea.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Citocinas. In: _____ - Imunologia celular e molecular. 2nd ed. Rio de Janeiro: Revinter 1998.p.253-76.

Abdo M, Hisheh S, Arfuso F, Dharmarajan A. The expression of tumor necrosis factor-alpha, its receptors and steroidogenic acute regulatory protein during corpus luteum regression. *Reprod Biol Endocrinol*. 2008; 6: 50-61.

Akimoto R; Pawankar R; Yagi T; Baba S. Acquired and congenital cholesteatoma: determination of tumor necrosis factor-alpha, intercellular adhesion molecule-1,interleukin-1-alpha and lymphocyte functional antigen-1 in the inflammatory process.*ORL* 2000;62:257-65.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*. 4^a ed. Nova York: Garland Science 2002. 831-906.

Alves AL, Pereira CSB, Ribeiro FAQ, Fregnani JHTG. Análise dos padrões histopatológicos do colesteatoma adquirido da orelha média. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2008; 74 (6):835-41.

Alves AL, Ribeiro FAQ. O papel das citocinas no colesteatoma adquirido da orelha média: revisão da literatura.*Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70 (6):813-8.

Amar MS; Wishahi HF; Zakhary MM. Clinical and biochemical studies of bone destruction in cholesteatoma. *J Laryngol Otol* 1996; 110(6):534-9.

Bingham CO. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol Suppl*. 2002; 65:3-9.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72 :3666-70.

Chung JW; Yoon TH. Different production of interleukin-1alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 from cholesteatomatous and normal epithelium. *Acta Otolaryngol*; 1998:118(3):386-91.

Dornelles C. Análise imunohistoquímica da Perimatriz de Colesteatomas Adquiridos. Porto Alegre. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2008.

Dornelles C, Rosito LPS, Meurer L, Costa SS, Argenta A, Alves SL. Correlação da cadeia ossicular no transoperatório com achados histológicos de colesteatomas. Rev Bras Otorrinolaringol. 2007; 73 (6):738-43.

Grech AP, Gardam S, Chan T, Quinn R, Gonzales R, Basten A, Brink R. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) Signaling Is Negatively Regulated by a Novel, Carboxyl-terminal TNFR-associated Factor 2 (TRAF2)-binding Site. J. Biol. Chem. 2005; 280 (36): 31572-81.

Iino K, Toryama M, Ogawa H, Kawakami M. Cholesteatoma debris as an activator of human monocytes. Acta otolaryngol 1990;110:410-5.

Kreutzer DL, Yellon RF, Leonard G, Marucha PT, Craven R, Carpenter RJ et al. Characterization of cytokines present in middle ear effusions. Laryngoscope 1991; 101:165-9.

Kurihara A, Toshima M, Yuasa R, Takasaka T. Bone destruction mechanisms in chronic otitis media with cholesteatoma: specific production by cholesteatoma tissue in culture of bone-resorbing activity attributable to interleukin-1 alpha. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1991 100(12):989-98.

Lessa HA, Freitas EB, Cruz OLM. Complicações das otites médias. In: SBORL. Tratado de otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Roca; 2003.p 43-9.

Lim DJ, Saunders WH. Acquired cholesteatoma: light and electron microscopic observation. Ann Otol 1972;81:2-12.

McFarlane SM, Pashmi G, Connel MC, Littlejohn AF, Tucker SJ, Vandenberg P, Macewand DJ. Differential activation of nuclear factor- κ B by tumour necrosis factor receptor subtypes. TNFR1 predominates whereas TNFR2 activates transcription poorly. FEBS Lett. 2002; 515(1-3):119-26

Pennica D, Nedwin GD, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Aggarwal BB, Khor WJ, Goeddel DV. Human tumor necrosis factor: precursor structure expression and homology to lymphotoxin. Nature 1984; 312: 7-24.

Pereira CSB. Imunoexpressão da citoqueratina 16 e do antígeno nuclear Ki-67 no colesteatoma adquirido da orelha média. Tese (doutorado). São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2001.

Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. Am J Physiol Renal Physiol 2003;285(4):F610-8.

Ribeiro FAQ, Pereira CSB. Otite média crônica colesteatomatosa In: SBORL. Tratado de Otorrinolaringologia. São Paulo: Editora Roca; 2003.p.93-102.

Sastry KVSSR, Sharma SC, Mann SBS, Ganguly NK e Panda NK. Aural cholesteatoma: role of tumor necrosis factor-alpha in bone destruction. Am J Otol; 1999; 20:158-61.

Schechter G. A review of cholesteatoma pathology. Laryngoscope 1969; 11:1907-20.

Tos M. Pathology of the ossicular chain in various chronic middle ear diseases. J Laryngol Otol; 1979;93:769-80.

Vitale RF, Ribeiro FAQ. O papel do fator de necrose tumoral Alfa no processo de erosão óssea presente no colesteatoma adquirido da orelha média. Rev Bras Otorrinolaringol; 2007; 73 (1) 123-27.

Yan SD, Huang CC. The role of tumor necrosis fator-alpha in bone reabsorption of cholesteatoma.Am J otolaryngol; 1991;12;83-9.

Yetiser S, Satar B, Aydin N. Expression of epidermal growth factor, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1alpha in chronic otitis media with or without cholesteatoma. Otol Neurotol; 2002; 23(5):647-52.

FONTES CONSULTADAS

Chapman Cf; Rothemberg MA. Barron's Dictionary of medical terms.4th ed. Hauppauge (NY): Barron's educational series; 2000.674p.

Dicionário Michaelis: english-portuguese/ inglês-português e português-inglês/ portuguese-english. São Paulo: Melhoramentos;1985. 856p.

Houaiss, A; Villar MS; Franco FMM. Minidicionário Houaiss da língua portuguesa. Rio de Janeiro: Editora objetiva; 2001. 481p.

Avanzi, O, relator. Normatização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo: 2004,26p.

Rónai P. Dicionário francês-português e português-francês. 3^a ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira; 1989.574p.

Dawson; B, Trapp R. Basic & Clinical Biostatistics. 4^a ed. Nova York: McGraw-Hill Companies; 2004. p134-61

RESUMO

Introdução: o colesteatoma adquirido da orelha média é uma doença que promove erosão óssea, ocasionando complicações potencialmente graves. O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) está presente no colesteatoma e relaciona-se com a erosão óssea, como demonstraram diferentes autores. Para que se compreendam as características de agressividade do colesteatoma é necessário, entretanto, que se estude melhor a presença e a distribuição seus receptores.

Objetivo: avaliar a expressão do receptor tipo dois do TNF- α (TNF-R2) em fragmentos de colesteatoma e correlacioná-lo com o grau de reabsorção óssea observado durante a cirurgia para sua retirada.

Material e métodos: estudo observacional do tipo transversal no qual foram analisados 33 fragmentos de colesteatomas submetidos à análise histológica e imunohistoquímica (utilizando como anticorpo primário o TNF-R2 da marca Labvision®). A avaliação foi realizada de forma qualitativa e semiquantitativa de acordo com a intensidade da coloração observada. Para a análise estatística foram utilizados o teste exato de Fischer e o índice de correlação de Spearman (considerando estatisticamente significativo quando $P \leq 0,05$).

Resultados: foi observada erosão da cadeia ossicular em 84,8% dos pacientes e a expressão do TNF-R2 ocorreu em todos os casos, entretanto a análise estatística não evidenciou correlação, nem associação entre a erosão óssea e a expressão do TNF-R2.

Conclusões: o TNF-R2 esta presente no colesteatoma adquirido da orelha média, entretanto, a sua expressão não está relacionada diretamente ao grau de erosão óssea observada em pacientes portadores desta doença.

ABSTRACT

Introduction: Cholesteatoma of middle ear disease is one that promotes bone erosion resulting in potentially serious complications. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is present in cholesteatoma of middle ear and is related to bone erosion, as shown by different authors. To understand the characteristics of aggressiveness of cholesteatoma is necessary, however, to address better the presence and distribution of their receptors.

Objective: To evaluate the expression of receptor type two TNF- α (TNF-R2) in fragments of colesteastoma and relate it to the degree of bone resorption observed during surgery for its removal

Methods: observational cross-sectional, which analyzed 33 fragments of cholesteatomas underwent histological analysis and immunohistochemistry (using as primary antibody to TNF-R2 LabVision ® brand). The evaluation was performed in a qualitative and semiquantitative agreement with the observed intensity. For the statistical analysis used the Fisher exact test and the index of correlation coefficient (considered statistically significant when $P \leq 0.05$).

Results: there was erosion of the chain in 84.8% and expression of TNF-R2 in all cases, however oa statistical analysis showed no correlation or association between bone erosion and the expression of TNF-R2.

Conclusions: TNF-R2 is present in cholesteatoma of the middle ear, however, its expression is not directly related to the degree of bone erosion observed in patients with this disease.

APÊNDICES



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Santa Isabel, 305 – 4º andar Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo –SP
 Fone Fax- 3337-0188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 25 de outubro de 2007.

Projeto nº 345/07
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr. Rodrigo Faller Vitale
 Departamento de Otorrinolaringologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP, em reunião extraordinária, dia **15/08/2007** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"A presença do receptor do fator de necrose tumoral alfa no colesteatoma adquirido da orelha média."**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive TCLE) ;**
- Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias. Enviar as alterações em duas cópias);
- Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- Não aprovado: e**
- Aprovado (inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)**, e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

Prof. Dr. Nelson Keiske Ono

Vice-Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. Identificação do Projeto de Pesquisa	
Título do Projeto: A presença do receptor do fator de necrose tumoral alfa no colesteatoma adquirido da orelha média	
Área do Conhecimento: Ciências da saúde – Medicina	
Curso: Otorrinolaringologia	
Número de sujeitos no centro:	Número total de sujeitos:
Patrocinador da pesquisa: FAPESP (apoio)	
Instituição onde será realizado: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo	
Pesquisador e Orientador: Rodrigo Faller Vitale e Prof. Dr. Fernande de A. Quintanilha Ribeiro	

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

2. Identificação do Sujeito da Pesquisa	
Nome:	
Data de Nascimento:	Nacionalidade:
Estado Civil:	Profissão:
CPF/MF:	RG:
Endereço:	
Telefone:	E-mail:

3. Identificação do Pesquisador Responsável	
Nome: Rodrigo Faller Vitale	
Profissão: médico	N. do Registro no Conselho: 94431 - SP
Endereço: R. Dr Cesário MottaJunior, 61 (4º andar)	
Telefone: (11) 3222-8405	E-mail: rfvitale@hotmail.com

Eu, sujeito da pesquisa, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do projeto de pesquisa acima identificado. Discuti com o pesquisador responsável sobre a minha decisão em participar e estou ciente que:

1. Os **objetivos** desta pesquisa são avaliar a presença do receptor do fator de necrose tumoral alfa no colesteatoma adquirido da orelha média, procurando observar a importância dele nas complicações decorrentes desta doença.
2. O **procedimento para coleta de dados** será feito a partir do material coletado durante o procedimento cirúrgico que foi enviado para exame anátomo-patológico. Isto não acarretará em nenhum risco adicional durante a cirurgia, uma vez que este procedimento é feito de rotina em todos os pacientes submetidos a mastoidectomia por colesteatoama.

3. O **benefício** esperado é entender melhor os mecanismos da destruição óssea que o colesteatoma provoca e com isso no futuro diminuir as morbidade (complicações) e mortalidade desta doença.
4. O **desconforto** e o **risco** esperados não existem, pois não será realizado nenhum procedimento adicional durante a cirurgia. A análise das peças retiradas durante a cirurgia será realizada em laboratório especializado.
5. A **minha participação** neste projeto tem como objetivo contribuir para elucidar os mecanismos de gênese (origem) e comportamento do colesteatoma adquirido da orelha média.
6. A **minha participação é isenta de despesas**.
7. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.
8. A minha desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no meu tratamento, bem como retardar qualquer atendimento ou assistência necessária decorrente da minha doença.
9. Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
10. Poderei consultar o **pesquisador responsável** (acima identificado) sempre que entender necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.
11. Tenho a garantia de tomar conhecimento, pessoalmente, do(s) resultado(s) parcial(is) e final(is) desta pesquisa.

Declaro que obtive todas as informações necessárias e esclarecimento quanto às dúvidas por mim apresentadas e, por estar de acordo, assino o presente documento em duas vias de igual teor (conteúdo) e forma, ficando uma em minha posse.

Local e data

Pesquisador Responsável pelo Projeto

Sujeito da pesquisa e/ou responsável

Testemunhas:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

Nome:
RG:
CPF/MF:
Telefone:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)